





**MANUFACTURE OF COTTON FIBER OF WHICH FIBER PROPERTY IS IMPROVED****Publication number:** JP9000097 (A)**Publication date:** 1997-01-07**Inventor(s):** KASUKABE YOSHIHISA; FUJISAWA KOICHI; NISHIGUCHI SUSUMU; MAEKAWA NOBUHIKO; RANDEI AREN**Applicant(s):** TOYO BOSEKI; UNIV TEXAS TECH [US]**Classification:**

**- International:** A01H1/00; A01H3/04; A01N49/00; C07J73/00; C07K14/415; C12N1/21; C12N5/04; C12N5/10; C12N15/00; C12N15/01; C12N15/09; C12N15/29; C12N15/82; C12R1/19; A01H1/00; A01H3/00; A01N49/00; C07J73/00; C07K14/415; C12N1/21; C12N5/04; C12N5/10; C12N15/00; C12N15/01; C12N15/09; C12N15/29; C12N15/82; (IPC1-7): C07J73/00; A01H3/04; A01H1/00; C12N1/21; C12N5/04; C12N5/10; C12N15/01; C12N15/09; C12N1/21; C12R1/19

**- European:** A01N49/00; C07K14/415; C12N15/82C4; C12N15/82C8

**Application number:** JP19960031983 19960220**Priority number(s):** US19950391696 19950221**Also published as:** JP3182072 (B2) US5932713 (A) US6225536 (B1) US5880110 (A)**Abstract of JP 9000097 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain cotton fibers improved in fiber properties such as increased fiber length, fineness and higher fiber strength by treating a cotton plant belonging to the genus *Gossypium* with a brassinosteroid and collecting cotton fibers therefrom. **SOLUTION:** A cotton plant belonging to the genus *Gossypium* selected from the group of *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium anommalum*, *Gossypium armourianum*, *Gossypium klotzchianum* and *Gossypium raimondii* is treated with a brassinosteroid such as brassinolides in the form of seeds or in any growing step, then grown to obtain its capsules. Then, the cotton fibers of this plant are collected from the capsules.

---

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-97

(43)公開日 平成9年(1997)1月7日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 H 3/04			A 0 1 H 3/04	
1/00			1/00	Z
C 1 2 N 1/21		7804-4B	C 1 2 N 1/21	
5/04			C 0 7 J 73/00	
5/10		9281-4B	C 1 2 N 5/00	F
審査請求 未請求 請求項の数25 O L (全 22 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平8-31983	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成8年(1996)2月20日	(71)出願人	596022994 テキサス テック ユニバーシティ アメリカ合衆国テキサス州 ラブボック ホールデン ホール 203番地 オフィス オブ リサーチ サービスズ
(31)優先権主張番号	0 8 / 3 9 1, 6 9 6	(72)発明者	春日部 芳久 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内
(32)優先日	1995年2月21日	(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 繊維特性の改善したワタ繊維の製造方法

(57)【要約】

【解決手段】 ゴシビウム属に属するワタ植物をブラシノステロイドで処理し、該植物よりワタ繊維を採取するワタ繊維の製造方法。

【効果】 ワタ繊維の特性の改善および収量の向上を行うことができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ゴシピウム(*Gossypium*) 属に属するワタ植物を種子形態において、または生育過程において、ブラシノステロイドで処理し、ワタ植物を生長させてワタ蒴果を得、さらに該植物の該ワタ蒴果からワタ繊維を採取することを特徴とする改良された繊維特性を有するワタ繊維の製造方法。

【請求項2】 ゴシピウム(*Gossypium*) 属のワタ植物が、ゴシピウム・ヒルスツム(*G.hirsutum*)、ゴシピウム・バルバデンセ(*G.barbadense*)、ゴシピウム・アルボレウム(*G.arboreum*)、ゴシピウム・アノマルム(*G.anomalum*)、ゴシピウム・アルムリアヌム(*G.armourianum*)、ゴシピウム・クロツツキアヌム(*G.klotzchianum*)、およびゴシピウム・レモンデイ(*G.raimondii*) からなる群から選ばれたものである請求項1記載の方法。

【請求項3】 ワタ植物の種子をブラシノステロイドで処理する請求項1記載の方法。

【請求項4】 生長するワタ植物をブラシノステロイドで処理する請求項1記載の方法。

【請求項5】 生長するワタ植物を部分的にブラシノステロイドで処理する請求項1記載の方法。

【請求項6】 処理されるべきワタ植物の部分が、蕾、花、胚珠、子房、苞、葉、茎、根、果梗および未成熟の蒴果から選択される請求項5記載の方法。

【請求項7】 開花後のワタ植物の子房をブラシノステロイドで処理する請求項6記載の方法。

【請求項8】 ブラシノステロイドがブラシノライド、ドリコライド、ホモドリコライド、24-エピブラシノライド、28-ノルブラシノライド、カスタステロン、ドリコステロン、ホモドリコステロン、ホモカスタステロン、28-ノルカスタステロン、ティファステロール、テアステロール、24-エピカスタステロン、2-エピカスタステロン、3-エピカスタステロン、3、24-ジエピカスタステロン、25-メチルドリコステロン、2-エピ-25-メチルドリコステロン、2、3-ジエピ-25-メチルドリコステロン、6-デオキシカスタステロン、6-デオキシドリコステロンおよび6-デオキシホモドリコステロンからなる群から選ばれた化合物である請求項1記載の方法。

【請求項9】 ブラシノステロイドを含む組成物が、液状、ペースト状、粉末、あるいは粒状である請求項1記載の方法。

【請求項10】 ブラシノステロイドが組成物中、 $1 \times 10^{-8}$ ~ $100 \text{ ppm}$ の濃度で含まれる請求項9記載の方法。

【請求項11】 請求項1記載の方法によって生産されたワタ繊維。

【請求項12】 ゴシピウム(*Gossypium*) 属に属するワタ植物の胚珠をブラシノステロイド含有液体培地中で培養し、培養された胚珠からワタ繊維を採取することを特

徴とする改良された繊維特性を有するワタ繊維の製造方法。

【請求項13】 ゴシピウム(*Gossypium*) 属のワタ植物が、ゴシピウム・ヒルスツム(*G.hirsutum*)、ゴシピウム・バルバデンセ(*G.barbadense*)、ゴシピウム・アルボレウム(*G.arboreum*)、ゴシピウム・アノマルム(*G.anomalum*)、ゴシピウム・アルムリアヌム(*G.armourianum*)、ゴシピウム・クロツツキアヌム(*G.klotzchianum*)、およびゴシピウム・レモンデイ(*G.raimondii*) からなる群から選ばれたものである請求項12記載の方法。

【請求項14】 ブラシノステロイドがブラシノライド、ドリコライド、ホモドリコライド、24-エピブラシノライド、28-ノルブラシノライド、カスタステロン、ドリコステロン、ホモドリコステロン、ホモカスタステロン、28-ノルカスタステロン、ティファステロール、テアステロール、24-エピカスタステロン、2-エピカスタステロン、3-エピカスタステロン、3、24-ジエピカスタステロン、25-メチルドリコステロン、2-エピ-25-メチルドリコステロン、2、3-ジエピ-25-メチルドリコステロン、6-デオキシカスタステロン、6-デオキシドリコステロンおよび6-デオキシホモドリコステロンからなる群から選ばれた化合物である請求項12記載の方法。

【請求項15】 ブラシノステロイドを含む液体培地が、ムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)、キャンボーグ(B5)、シェンク・アンド・ヒルデブランド(SH)、ホワイト(W)、リンズマイヤー・アンド・スクーグ(LS)およびビスレイ・アンド・チンク(BT)培地からなる群から選ばれた培地である請求項第12記載の方法。

【請求項16】 ブラシノステロイドが組成物中、 $1 \times 10^{-8}$ ~ $100 \text{ ppm}$ の濃度で含まれる請求項12記載の方法。

【請求項17】 請求項12記載の方法によって生産されたワタ繊維。

【請求項18】 ワタ植物を種子形態においてまたは生育過程において、ブラシノステロイドで処理することを特徴とするワタ植物中で特定の遺伝子を発現させて、改良された繊維特性を有するワタ繊維を生産する方法。

【請求項19】 ゴシピウム(*Gossypium*) 属の植物が、ゴシピウム・ヒルスツム(*G.hirsutum*)、ゴシピウム・バルバデンセ(*G.barbadense*)、ゴシピウム・アルボレウム(*G.arboreum*)、ゴシピウム・アノマルム(*G.anomalum*)、ゴシピウム・アルムリアヌム(*G.armourianum*)、ゴシピウム・クロツツキアヌム(*G.klotzchianum*)、およびゴシピウム・レモンデイ(*G.raimondii*) からなる群から選ばれたものである請求項18記載の方法。

【請求項20】 ブラシノステロイドがブラシノライド、ドリコライド、ホモドリコライド、24-エピブラシノライド、28-ノルブラシノライド、カスタステロ

ン、ドリコステロン、ホモドリコステロン、ホモカステロン、28-ノルカステロン、ティファステロール、テアステロール、24-エピカステロン、2-エピカステロン、3-エピカステロン、3, 24-ジエピカステロン、25-メチルドリコステロン、2-エピ-25-メチルドリコステロン、2, 3-ジエピ-25-メチルドリコステロン、6-デオキシカステロン、6-デオキシドリコステロンおよび6-デオキシホモドリコステロンからなる群から選ばれた化合物である請求項18記載の方法。

【請求項21】 ブラシノステロイドを含む組成物が、液状、ペースト状、粉末、あるいは粒状である請求項18記載の方法。

【請求項22】 ブラシノステロイドが組成物中、 $1 \times 10^{-8}$ ～ $100 \text{ ppm}$ の濃度で含まれる請求項21記載の方法。

【請求項23】 特定遺伝子の少なくとも1つが配列表・配列番号1に記載の塩基配列を含む請求項18の方法。

【請求項24】 請求項18の方法によって得られたワタ植物。

【請求項25】 請求項18の方法によって得られたワタ種子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は増加した繊維長、繊維度およびより高い繊維強度などの繊維特性を改善したワタ繊維の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】通常、ワタ繊維はゴシピウム属に属するワタ植物を栽培し、ワタ植物上に得られたさく果（コットンボール）より採取することにより製造する。ワタ植物には種々の品種があり、それぞれ異なった繊維特性を有するワタ繊維が得られ、その繊維特性に応じて各種用途に使分けられている。ワタ繊維は種々の特性値によって特徴づけられるが、その中でも、特に重要なものとして繊維長、繊維度、強度が挙げられる。従来より、ワタ繊維の特性を改善するため多大な努力がなされてきたが、その繊維特性を改善する中心は、繊維長と繊維度であった。その中でも、特により長く細い繊維が望まれてきた。このような繊維特性を有する品種としては、海島綿が有名であるが、しかし、この品種は生産性が低く、大変高価である。もし、海島綿と同等以上の繊維特性を有するワタ繊維をより高い生産性で得ることができれば、産業上非常に有益である。

【0003】ワタ繊維の繊維特性あるいは収量を改善させる方法としては、大きく分けて3つの方法がある。

#### 1. 交配育種による品種改良

この方法は、従来より最もよく利用されてきた方法である。現在、ワタ植物の栽培品種として利用されているも

のは、ほとんど、この方法により育種されたものである。しかしながら、該方法は長い時間を要する上、品種を改善できるレベルに限度があり、繊維特性の改良および生産性に飛躍的な向上はあまり期待できない。

【0004】2. 植物ホルモンによる処理

オーキシシン、ジベレリン、サイトカイニンおよびエチレン等の植物ホルモンは、農作物や園芸分野において幅広く実用化されている。ワタ植物の繊維生成、特に繊維伸長メカニズムに対する植物ホルモンの影響は、これまで数多く報告されている。ジベレリンやオーキシシンは繊維の伸長を誘導し、アブシジン酸は、逆に繊維伸長を抑制すると考えられている (Bhardwaj and Sharma, 1971; Singh and Sing, 1975; Baert et al., 1975; Dhindsa et al., 1976; Kosmidou, 1976; Babaev and Agakishiev, 1977; Bazanova, 1977; DeLanghe et al., 1978)。また、BeasleyとTing [Amer. J. Bot. 60(2): 130-139, 1973] は、胚珠培養 (in vitro) で、ジベレリンは繊維伸長に対して促進効果を示し、カイネチンとアブシジン酸は繊維伸長の抑制効果を示したと報告している。圃場試験 (in vivo) では、不受精 (non-fertilized) の開花直後の花に、ジベレリンを行ったところ、ある程度の繊維伸長に促進効果が見られたと報告している。しかし、受粉 (fertilized) の花では、ジベレリン ( $\text{GA}_3$ ) 処理による有意な伸長促進効果は起こらなかった (The Cotton Foundation Reference Book Series Number 1, Cotton Physiology, 369, The Cotton Foundation, 1986)。

【0005】ワタ繊維の繊維収量に対する植物ホルモンの影響については、McCartyとHedinは、1986年～1992年の期間にわたって、商業用植物調節剤 (commercial plant growth regulators) の圃場試験を行ったところ、1992年の圃場試験のみ、サイトカイニンを含む植物調節剤 Foliar Trigger (Westbridge Chemical Co. 製) と、サイトカイニン、インドール酢酸、ジベレリンを含む植物調節剤 FPG-5 (Balbridge Bio-Research Inc., 製) で、繊維収量の増加が観察されたと報告している。しかし、他の年については有意な収量増加は観察されなかった [J. Agric. Food Chem. 42: 1355-1357, (1994)]。

【0006】以上のように、ワタ繊維の繊維特性や生産性の向上を目指して、オーキシシン、ジベレリン、サイトカイニンおよびアブシジン酸などの従来の植物ホルモンについては数多く研究、報告されているが、その効果が十分確認されたとはいえず、実用的なものとはいえない。

【0007】近年、新しい植物ホルモンの1つとしてブラシノステロイドが注目されており、各種植物に対する、これらのホルモンの作用が研究されている。最初、ミッチェル、マンドーバラがセイヨウアブラナの花粉の中から、ブラシノステロイドの1種であるブラシライド

を発見し [Mitchell, J. W., N. Mandava, et al, Nature, 225, 1065, (1970)], インゲンマメの若芽に使用することにより、きわめて顕著な細胞伸長作用があることが確認された。ブラシノライドは上記したように、複雑な構造を有するステロイド化合物の1種であり、その後、種々の植物から類似の構造をもつ植物ホルモンが発見されている。

【0008】ブラシノステロイドをワタ植物に適用した例としては、圃場試験 (in vivo) で Lu o ら (Plant Physiology Communications, 5, 31-34, 1988) は、0.01 ppm と 1 ppm のブラシノライドを果梗に処理すると、子房の落果が抑制されたと報告している。しかし、これまでのところブラシノステロイドによって繊維特性や生産性が向上した例は報告されていない。

【0009】カルス培養 (in vitro) においては、Wang ら [Plant Physiology Communications, 28(1), 15-18, 1992] は、0.01 ppm のブラシノライドを MS 培地に添加することによって、ワタ植物においてカルス形成と胚形成が誘導されたと報告している。しかし、胚珠培養によるワタ繊維の製造においては、培地中にブラシノステロイドを添加することにより、ワタ繊維の繊維特性、収量が改善されたという例は報告されていない。

【0010】3. 遺伝子組換え技術を利用した品種改良  
近年の遺伝子組換え技術の発達にはめざましいものがあり、ある種の植物 (例えばトマト、ダイズなど) では、これらの植物中へ特定の遺伝子を導入、発現させることにより目的の形質への品種改良に成功した、いくつかの例が報告されている。もし、ワタ植物にワタの繊維形成及び伸長に関与している遺伝子を導入し、大量発現させることができれば、ワタ繊維の繊維特性或いは生産性を飛躍的に改善することが可能となる。しかしながら、現在のところ、ワタ植物に関するものでは、以下のような研究しか行なわれていない。BT 毒素 (Bacillus thuringiensis 産生殺虫性蛋白毒素) をコードする遺伝子を導入し、耐虫性の向上を目的としたもの、5-エノールビルビルシキミ酸 3-リン酸合成酵素をコードする遺伝子を導入し、除草剤 (グリホセート) 耐性の向上を目的としたものが研究されている。これらの試みは結果的に単位面積当たりの生産性の向上には寄与するが、ワタ植物1株当たりのワタ繊維の生産性の向上には寄与しない。ワタ植物におけるワタ繊維の形成及び伸長の機構については今なお十分に解明されておらず、関与する遺伝子についてもほとんどわかっていないのが現状である。

【0011】本発明者らは、このような状況下に、ワタ繊維の繊維特性を改善あるいは生産性を向上させるために鋭意研究した。その結果、この問題はブラシノステロイドで処理することによって解決されることを見だし、さらにワタ繊維の形成および伸長に関与する遺伝子を見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】すなわち、本発明は改良された繊維特性を

有するワタ繊維を生産する方法ならびにこれらの方法によって生産されたワタ繊維を提供するものである。1つの方法はゴシビウム (Gossypium) 属に属するワタ植物を種子形態において、または生育過程において、ブラシノステロイドで処理し、ワタ植物を生長させてワタ蒴果を得、さらに該植物の該ワタ蒴果からワタ繊維を採取することを特徴とする改良された繊維特性を有するワタ繊維の製造方法である。他の方法は、ブラシノステロイド含有液体培地中でゴシビウム (Gossypium) 属に属するワタ植物の胚珠を培養し、培養された胚珠からワタ繊維を採取することを特徴とする改良された繊維特性を有するワタ繊維の製造法である。

【0013】本発明は、また、ワタ植物を種子形態において、または生育過程において、ブラシノステロイドで処理することを特徴とするワタ植物中で特定の遺伝子を発現させて、改良された繊維特性を有するワタ繊維を生産する方法である。また、該方法で得られたワタ植物および該方法で得られたワタ種子である。なお、本発明において「改良された繊維特性を有するワタ繊維」とは、例えば、繊維長、繊維繊度、繊維強度等の点において、従来のワタ繊維よりも優れているワタ繊維をいう。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明によるワタ繊維を生産する方法は、ワタ植物をブラシノステロイドによって、ワタ繊維の特性および生産性が改良されるとの新規な知見に基づくものである。本発明の方法は、ワタ植物の種々の品種、例えばゴシビウム・ヒルスツム (G. hirsutum)、ゴシビウム・バルバデンセ (G. barbadense)、ゴシビウム・アルボレウム (G. arboreum)、ゴシビウム・アノマルム (G. anomalum)、ゴシビウム・アルムリアヌム (G. armourianum)、ゴシビウム・クロツキアヌム (G. klotzchianum)、およびゴシビウム・レモンデイ (G. raimondii) からなる群から選ばれたものなどに適用される。

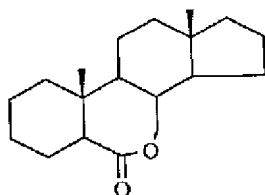
【0015】本発明の方法によって処理されるワタ植物は、種子形態、または生育過程にあるものである。生育中のワタ植物は全体に、あるいは部分的に処理される。ブラシノステロイドを含有する組成物で処理することのできる部位としては、特に限定されないが、好ましくはワタ植物の全樹、蕾、花、胚珠、子房、苞、葉、茎、根、果梗、未成熟の蒴果などである。処理することのできる生育過程としては、特に限定されないが、好ましくは開花後、さらに好ましくは開花2日後から20日後が挙げられる。

【0016】本発明の方法にて使用するブラシノステロイドは、以下のように異なったステロイド骨格を有する種々の化合物を含む。ブラシノライド (2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ , 22R, 23R-テトラヒドロキシ-24S-メチル-B-ホモ-7-オキサ-5 $\alpha$ -コレスタン-6-オン)、ドリコライド、ホモドリコライド、24-エピブラシノライド、28-ノルブラシノライドなどの第1タイプの

化合物は、下記式のステロイド骨格を有する。

【0017】

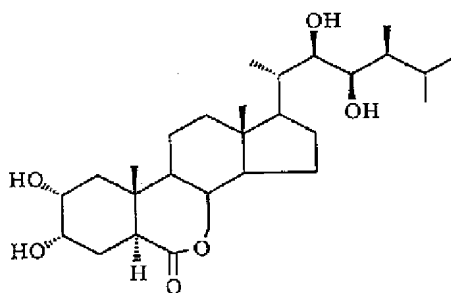
【化1】



【0018】例えばブラシノライドは下記化学構造式で示される。

【0019】

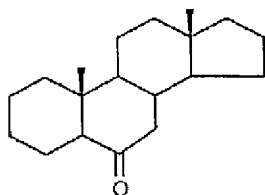
【化2】



【0020】例えば、カステステロン、ドリコステロン、ホモドリコステロン、ホモカステステロン、28-ノルカステステロン、ティファステロール、テアステロール、24-エピカステステロン、2-エピカステステロン、3-エピカステステロン、3, 24-ジエピカステステロン、25-メチルドリコステロン、2-エピー25-メチルドリコステロン、2, 3-ジエピー25-メチルドリコステロンなどの第2タイプの化合物は、下記式のステロイド骨格を有する。

【0021】

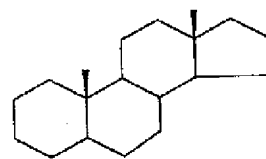
【化3】



【0022】例えば、6-デオキシカステステロン、6-デオキシドリコステロンおよび6-デオキシホモドリコステロンなどの第3タイプの化合物は、下記式のステロイド骨格を有する。

【0023】

【化4】



【0024】これらブラシノステロイドを含む組成物の形態は、特に限定されないが、好ましくは液状、粒状、粉末状、ペースト状で用いることができる。また、該組成物中のブラシノステロイドの含有率は、低濃度であれば特に制限はなく、通常 $1 \times 10^{-8} \sim 100 \text{ ppm}$ 、好ましくは $1 \times 10^{-6} \sim 50 \text{ ppm}$ 、さらに好ましくは $1 \times 10^{-4} \sim 10 \text{ ppm}$ である。

【0025】さらに、該ブラシノステロイド含有組成物に、オーキシシン、ジベレリン、サイトカイニン、アブシジン酸などの植物ホルモンを添加してもよい。また、必要に応じて界面活性剤、乳化剤、展着剤、賦形剤などを添加してもよい。

【0026】組成物が液状の場合、ブラシノステロイドを所定量、水に溶解または分散させたものを用いてもよいが、安定して効果を発現させるため通常、水以外に乳化剤、展着剤、希釈剤などを添加して用いる。また、一般的には濃厚液を調製し、使用前にこれを所定の濃度まで水で希釈して使用する。

【0027】例えば濃厚液の調製例を以下に示す。

(1) メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*i*-sopropanol、*n*-ブタノール、*i*-sopropanol、*sec*-ブタノール等の低級脂肪族アルコールを50～98重量%、好ましくは60～95重量%

(2) ジメチルホルムアミド (DMF)、*N*-メチルピロリドン (NMP)、ジメチルアセトアミド (DMAA) 等のアミド系極性溶媒およびジメチルスルホキシドを1～25重量%、好ましくは2～20重量%

(3) ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリブチレングリコールの如きポリアルキレングリコール、およびポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールあるいはこれらの共重合体等から選ばれる水溶性ポリマーを1～25重量%、好ましくは2～20重量%

(4) ポリオキシエチレンジアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル、ポリオキシエチレンジアルキルエーテルの如きポリオキシアルキレンエーテル系；ポリオキシエチレンジアルキルエステル、ポリオキシエチレンアルキルアリルエステル、ポリオキシエチレンジアルキルエステルの如きポリオキシアルキレンジエステル系；ジナフチルメタンスルホン酸ナトリウム、リグニンスルホン酸カルシウムジアルキルスルホサクシネートの如きスルホン酸塩等から選ばれる展着剤を水以外の成分の重量にして、上記(1)、(2)および

(3) からなる組成物1重量部に対して0.003～

1. 8重量部、好ましくは0.1~1.7重量部

【0028】組成物がペースト状品の場合、前述の液状品にラノリン、ワセリン等のペースト剤を混合することにより調製できる。

【0029】組成物が粉末状品の場合は、ブラシノステロイドを適当量のクレイ、カオリン、タルク、珪藻土、シリカ、炭酸カルシウム、モンモリナイト、ベントナイト、長石、石英、アルミナ、おがくずなどの固体担体を混合することにより調製することができる。

【0030】また、組成物が顆粒状品の場合は、上述の粉末状品を定法に従い造粒し、調製することができる。

【0031】本発明では、ワタ植物の種子形態および生育過程において、ブラシノステロイドの処理を施すには、ブラシノステロイド含有組成物を、ワタ植物の全樹、蕾、花、胚珠、子房、苞、葉、茎、根、果梗、未成熟の蒴果への散布、塗布、浸漬等の手段により実施する。ブラシノステロイドの効果を持続させるため、ブラシノステロイドをラノリン等に混ぜ合わせたペーストを果梗、子房に塗布するようにしてもよい。また、短時間に、操作上より簡便に処理する方法として、有機溶剤中にブラシノステロイドを溶解または分散させたものに、ワタの種子を浸漬するようにしてもよい。一般には全面散布するのが好ましい。特に好ましいのは、繊維伸長時期である開花2日後から開花20日後の子房に集中的に散布すると一層効果的である。

【0032】このように処理されたワタ植物は、成長してワタ蒴果を形成し、さらに該植物の該ワタ蒴果から改良されたワタ繊維特性を有するワタ繊維を採取する。改良された繊維特性を有するワタ繊維は、また、ブラシノステロイド含有液体培地中でワタ植物の胚珠から得ることができる。該胚珠培養は下記方法で行なわれる。

【0033】本発明方法において用いることのできる液体培地としては、ワタ植物の胚珠が生育できるものであれば何でもよいが、好ましくは、ムラシゲ・アンド・スクーグ (MS)、ギャンボーグ (B5)、シェンク・アンド・ヒルデブラント (SH)、ホワイ (W)、リンズマイヤー・アンド・スクーグ (LS) およびビスレイ・アンド・チンク (BT) 培地からなる群から選ばれた培地であり、これらの培地にブラシノステロイドを添加したものを用いることができる。特に好ましいのはビスレイ・アンド・チンク (BT) の培地である。

【0034】ブラシノステロイドの添加量は、胚珠培養 (in vitro 培養系) の培地に対して、低濃度であればよく、一般に  $1 \times 10^{-8}$  ppm ~ 100 ppm、好ましくは  $1 \times 10^{-6}$  ppm ~ 50 ppm、特に好ましくは  $1 \times 10^{-4}$  ppm ~ 10 ppm である。

【0035】さらに、ブラシノステロイドの他に、糖類、ビタミン類、植物ホルモン等を添加するのが好ましい。添加することのできる植物ホルモンとしては、インドール酢酸 (IAA)、ナフタレン酢酸 (NAA)、イ

ンドール酢酸 (IBA)、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) 等のオーキシニン類や、GA<sub>3</sub>等のジベレリン、カイネチン等のサイトカイニン、アブシジン酸が挙げられこれらは単独で、または適宜組み合わせで使用される。その添加濃度は通常、0.005 μM ~ 100.0 μM の範囲である。好ましくは、0.05 μM ~ 50 μM の範囲である。

【0036】ブラシノステロイドを培地に添加するにあたっては、水に難溶であるため、有機溶媒中に溶解させた後、水と混合して培地に添加する。かかる有機溶媒としては、メタノール、エタノール、プロパノールの如き低級脂肪族アルコール類；メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトンの如き低級脂肪族ケトン類；ジメチルエーテル、ジエチルエーテルの如き低級脂肪族エーテル類を挙げるることができる。

【0037】本発明方法によるワタの胚珠培養は、上記の如きブラシノステロイド添加培地を用いるほかは、常法に従って行うことができる。例えば、ワタ植物の胚珠を次亜塩素酸ナトリウム溶液等で殺菌した後、これを無菌的にブラシノステロイド添加液体培地上に設置し、静置培養することができる。培養温度は通常20~40℃、好ましくは25~35℃である。改良された特性を有するワタ繊維はこのように培養した胚珠から収集する。

【0038】本発明では、上記した方法によって種子の形態でまたはワタ植物生育過程に、ブラシノステロイド処理を行うことによって、繊維長が増大するなどの繊維特性の向上が観察された。この事実から見て、ワタ植物の遺伝子群の中で特定の遺伝子の発現量が顕著に変化し、これらの遺伝子がワタ繊維の形成及び伸長に関与していることが推察できる。

【0039】上記方法で生育させたワタ植物より、その発現量が変化した遺伝子の単離方法としては、ディファレンシャルスクリーニング法、サブトラクション法、ディファレンシャルディスプレイ法等を用いることができる。

【0040】以下に、ディファレンシャルスクリーニング法での単離法について、詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

(1) ワタ繊維の形成及び伸長に関する遺伝子の単離

1. cDNAライブラリーの構築  
まず、繊維伸長期のワタ植物の胚珠からワタ繊維を分離し、分離したワタ繊維から常法に従い、poly (A)<sup>+</sup> RNAを抽出した。単離したpoly (A)<sup>+</sup> RNAを鋳型として、オリゴ (dT) プライマーと逆転写酵素を用いて1本鎖のcDNAを合成し、この1本鎖cDNAをポリメラーゼ反応によって2本鎖化する。2本鎖cDNAを適当なベクターに挿入し、大腸菌等の宿主細胞をに形質転換することにより、cDNAライブラリーを作製する。poly (A)<sup>+</sup> RNAの単離およびcDNA

の合成は、市販されているcDNAクローニングキットを使用してもよい。また、cDNAライブラリーの作製に用いるベクターは、多数種市販されており、これらを使用することもできる。

【0041】2. cDNAライブラリーから目的遺伝子のスクリーニング

目的遺伝子は次のディファレンシャルスクリーニング法によって得ることができる。上記方法で作製したcDNAライブラリーのフェージブランクからレプリカした2枚のフィルターに、繊維伸長期のワタ繊維（処理区）から同様な方法で調製したcDNAと、繊維伸長停止期のワタ繊維（対照区）から調製したcDNAを、放射性同位元素である $^{32}\text{P}$ で標識したものを各々プローブとしてハイブリダイズさせ、処理区cDNAから調製したプローブのみからの陽性を示すハイブリダイゼーション・シグナルを検出することにより、目的遺伝子のcDNAを選抜することができる。

【0042】RNAの単離、cDNAの合成、DNAの切断、連結、形質転換、ハイブリダイゼーションおよび他の一般の遺伝子組換えに必要な方法は、各操作に使用する市販の酵素等に添付されている説明書や、種々の教科書、（例えばMolecular cloning, Maniatis ら編集、Cold Spring Harbor, 1989 あるいはCurrent Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel ら編集、John Wiley & Sons, Inc., 1987）に記載されている。

【0043】クローン化されたcDNAの塩基配列の決定は、Maxam-Gilbert法あるいは、ダイデオキシ・チェーンターミネーション法等により決定できる。いずれの方法も市販されているキットを用いて行うことができる。核酸配列決定は、また自動的に行うオートシーケンサーを使用してもよい。

【0044】もし決定されたcDNAクローンが完全長のタンパクをコードする遺伝子でない場合は、常法にしたがって再度、他のブランクハイブリダイゼーション、又はRACE法などにより完全長のタンパクをコードする遺伝子を有する所望のcDNAクローンを得ることができる。

【0045】このようにして、ワタ繊維から得られた遺伝子の1つについて、塩基配列を配列番号1、該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号2に示す。なお、この遺伝子には、細胞壁に効果的に移行する能力を有するシグナルペプチドをコードする配列も包含されている。

【0046】(2) ワタ繊維の形成及び伸長に関する遺伝子の利用

上記した方法により得た遺伝子を、ワタ又はワタ以外の植物において、繊維の形成及び伸長に関するタンパクの大量生産に利用することができる。さらにシグナルペプチドをコードするDNA配列は、細胞壁での各種タンパクの発現による細胞壁成分の改変に利用され、このよ

うな技術は耐病性等を付与した新規植物の育種にも応用できる。例えば、繊維の形成及び伸長に関する遺伝子を適当なプロモーターに接続して、ワタあるいは他の植物に導入すると、目的タンパクの含量を増大させることができる。これに対し、前記遺伝子のアンチセンス鎖（コード配列に相補的な配列）の少なくとも一部を逆向きに適当なプロモーターに接続したものを植物に導入し、いわゆるアンチセンスRNAを発現させると、目的タンパク含量を低下させることができる。また、シグナルペプチドをコードするDNA配列に、他の遺伝子を接続したものを植物に導入すると、その遺伝子産物を細胞壁に効率よく移行させることができる。

【0047】植物の形質転換方法としては、プロトプラストに電気パルス処理してプラスミドを導入するエレクトロポレーション法や、小細胞、細胞、リソソーム等とプロトプラストとの融合法、マイクロインジェクション法、ポリエチレングリコール法、あるいは、パーティクルガン法等の方法を挙げることができる。

【0048】また、植物ウイルスをベクターとして利用することによって、目的遺伝子を植物体に導入することができる。利用する植物ウイルスとしては、例えばカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)を用いることができる。例えば目的遺伝子の導入は次の方法に従う。すなわち、まずウイルスゲノムを一旦、大腸菌等由来のベクターに挿入して組換え体を調製した後、ウイルスのゲノム中にこれらの目的遺伝子を挿入する。このようにして修飾されたウイルスゲノムを制限酵素により、該組換え体から切り出し、植物に接種することによって、目的遺伝子を植物体に挿入することができる〔ホーン(Hohn)ら、モレキュラー バイオロジー オブ プラント

チューモアーズ(Molecular Biology of Plant Tumors)、アカデミック プレス、ニューヨーク(Academic Press, New York)、第549～560頁(1982)、米国特許第4,407,956号〕。

【0049】さらに、アグロバクテリウムのTiプラスミドを利用する方法がある。アグロバクテリウム属に属する細菌が植物に感染すると、それが持っているプラスミドDNAの一部を植物ゲノム中に移行させる。このような性質を利用して、これらの目的遺伝子を植物体に導入することもできる。アグロバクテリウム属に属する細菌のうち、アグロバクテリウム ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)は植物に感染してクラウンガールと呼ばれる腫瘍を、アグロバクテリウムリゾゲネス(Agrobacterium rhizogenes)は植物に感染して毛状根を引き起こす。これらの細菌はT-DNA(Transferred DNA)とvir領域を有するTiプラスミド、またはRiプラスミドと呼ばれる、プラスミドを有する。腫瘍形成はT-DNA領域(Transferred DNA)が植物ゲノム中に移行し、植物細胞中のT-DNAに存在する腫瘍形成遺伝子の複写および翻訳されることに起因する。v



i r領域自身は、植物細胞中に移行されることはないが、T-DNAの移行には必須である。また、このv i r領域はT-DNA領域を含むプラスミドと異なった他のプラスミド上にあっても機能しうる〔Nature, 303, 179, (1983)〕。

【0050】T i又はR iプラスミド上のT-DNA領域中に、植物ゲノム中に組み込みたい目的DNAを挿入しておけば、アグロバクテリウム属の細菌が植物体に感染する際に目的とするDNAを植物ゲノム中に組み込むことができる。また、T i又はR iプラスミドのT-DNA中のクラウンゴール、又は毛状根を引き起こす部分を、目的とする移行機能を損なうことなく取り除き、得られたプラスミドをベクターとして使用することもできる。

【0051】本発明においてはこのような種々のベクターを用いることができる。例えば、バイナリーベクターと呼ばれるp B I 1 2 1 (クロンテック社)等のベクターに、適当なプロモーターに繊維の形成及び伸長に関与する遺伝子をセンス方向に接続したもの、または該遺伝子をアンチセンス方向に接続したものを挿入して、これらを植物体に導入することができる。なお、これらのバイナリーベクターは前出のv i r領域を有しておらず、該ベクターを導入して用いるアグロバクテリウム属の細菌は、v i r領域を有している他のプラスミドを含有している必要がある。

【0052】また、これらのベクターはアグロバクテリウム属の細菌だけではなく、大腸菌中でも増幅することができるシャトルベクターとしても使用できる。したがって、T iプラスミドの組換え操作は、大腸菌を用いて行うことができる。更に、これらのベクターは、抗生物質耐性遺伝子を含んでおり、大腸菌、アグロバクテリウム属の細菌、及び植物体等を形質転換する際に、形質転換体を容易に選別することができる。また、これらのベクターには、さらにCaMVの35Sプロモーターが存在しており、これらのベクターに挿入された遺伝子を植物ゲノム中に組み込んだ後、非調節的に発現させることが可能となる。

【0053】以下に、シロイヌナズナにおける、アグロバクテリウムによる目的遺伝子の植物体への導入、及び形質転換細胞の植物体への再生法を例示する。シロイヌナズナの種子を常法に従って、MSOプレート(ムラシゲースクグ無機塩類4.6g、ショ糖10g、1000×ビタミンストック液1ml/リットル、pH6.2)に播種し、無菌的に栽培する。発根した根の切片を用いてCIMプレート(MSOプレートに2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を終濃度0.5μg/ml、カイネチンを0.05μg/mlとなるように加えたもの)上で、カルス培養を行う。プロモーターに目的遺伝子を接続し、カナマイシン及びハイグロマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドに挿入する。このプラスミドにより形質転換したアグロバクテリウムを培養し、希釈したものをチュー

ブに分注する。カルス化した根の切片をこれらのチューブ中に浸し、数日間、CIMプレート上で共存培養する。菌株が肉眼で観察できるまで十分に増殖したら、根の切片に除菌操作を行ない、SIMCプレート(MSOプレートに、2-i pを終濃度5μg/ml、インドール酢酸を終濃度0.15μg/ml、クラフオリンを終濃度500μg/mlとなるように加えたもの)上で数日間培養を行う。これらの切片を最終的にSIMCSプレート(カナマイシン及びハイグロマイシンBを含有するプレート)上で培養し、1週間ごとに新しいプレートに移植を繰り返す。

【0054】形質転換した切片は増殖を続け、カルスが現れてくる。抗生物質で選択しているため、非形質転換切片は褐変する。形質転換体が約5mm程度の大きさになり、シュート葉を形成するまで培養を続ける。完全なロゼットの形状を示すようになったら、形質転換体の根元をカルス部分を含まないようにメスで切り取り、RIMプレート(MSOプレートにインドール酢酸を終濃度0.5μg/mlとなるように加えたもの)に移植する。もし形質転換体から切り取った部分に大きなカルスが付いていると、たとえ発根してもカルスを介して根が出ていて、シュートとは維管束が繋がっていないことが多い。約8~10日後、無機塩類培地〔5mM KN O<sub>3</sub>、2.5mM K-リン酸緩衝液(pH5.5)、2mM MgSO<sub>4</sub>、2mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、50μM Fe-EDTA、1000×微量要素(70mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、14mM MnCl<sub>2</sub>、0.5mM CuSO<sub>4</sub>、1mM ZnSO<sub>4</sub>、0.2mM NaMoO<sub>4</sub>、10mM NaCl、0.01mM CoCl<sub>2</sub>)1ml/リットル〕に浸したロックウール上にこれらの部分を定植する。

【0055】開花し、莢を形成した植物体は無機塩類培地に浸した土に移植し、種子を得ることができる。この種子を滅菌処理し、MSH(MSOプレートのハイグロマイシンBを終濃度5U/mlとなるように加えたもの)に播種して、発芽させることにより形質転換植物を得ることができる。

【0056】この形質転換植物より、常法に従ってDNAを抽出し、このDNAを適当な制限酵素で切断し、繊維の形成及び伸長に関与する遺伝子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行ない、植物において生じた形質転換の有無を確認することができる。

【0057】また、形質転換体や、非形質転換体より、常法に従ってRNAを抽出し、繊維の形成及び伸長に関与する遺伝子のセンス、若しくはアンチセンス配列を有するプローブを作成し、これらのプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行ない、目的遺伝子の発現の状態を調べることができる。

【0058】繊維の形成及び伸長に関与する遺伝子はワタ繊維細胞において、ワタ繊維形成過程で特異的に発現

し、繊維伸長に関与する。したがって、もし、この遺伝子の塩基配列をワタ繊維伸長のマーカーとして利用すれば、繊維伸長のメカニズムの解明およびそれを調節する遺伝子の単離を可能にするものである。

【0059】繊維の形成及び伸長のマーカーであり、繊維の形成及び伸長に必要である目的タンパクを用いれば、繊維の形成及び伸長を誘導する技術の確立および繊維の形成及び伸長のメカニズムの解明およびそれを調節する遺伝子の単離に利用することができる。したがって、本発明は細胞形成及び伸長の技術分野においてもきわめて有用である。

【0060】さらに、繊維の形成及び伸長に関与するタンパクをコードしている塩基配列は、インビトロの転写系などの人工的な手法、あるいは大腸菌などの微生物を用いて遺伝子の発現を行うことによって、繊維の形成及び伸長に関与するタンパクを大量に、かつ純粋な形で得ることができる。このようにして得られたタンパクは繊維の形成及び伸長に関与するタンパクであることから、植物細胞壁の構造を変化させることができ、さらに工業分野で用いられる植物原料の加工に有用である。

【0061】本発明の該遺伝子は、繊維の形成及び伸長に関与する遺伝子であることから、植物細胞生長過程に関与する基幹遺伝子であると考えられる。したがって、例えばカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターを用いることによって、植物の器官全体に生活環の全過程を通して形態変化をもたらすことができる。光、熱あるいは傷害などの調節性のプロモーターを用いれば、生育環境に応じてその形態が変化する植物体を作製することができる。また、器官又は組織特異的なプロモーターを用いれば、特定の器官、又は組織だけに形態変化を生じさせることができる。例えば、繊維形成時にだけ転写を起こさせ得るプロモーターを用いることによって、繊維の形成を制御し、繊維特性の変化をもたらすことができる。

#### 【0062】

【発明の効果】本発明により、ワタ繊維の特性（繊維長、繊維度、強度等）の改善および収量の向上を行うことができる、さらに本発明の遺伝子を利用することにより、より優れた繊維特性を有し、且つ生産性の高い、遺伝的に固定されたワタ植物の新品種を作出することができる。

#### 【0063】

【実施例】以下、この発明の実施例を詳細に説明する。これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1 圃場栽培での繊維特性に対するブラシノライドの効果

#### 〔1〕ブラシノライド含有液体組成物の調製

(1) ブラシノライド0.01ppm含有水溶液  
ブラシノライド（富士薬品工業社製）0.1mgに数mlのエタノールを加え溶解し、溶解後、10リットルの水を

加えて、ブラシノライド含有量が0.01ppmであるブラシノライド水溶液を調製した。

#### (2) ブラシノライド0.1ppm含有水溶液

ブラシノライド（富士薬品工業社製）1mgに数mlのエタノールを加え溶解し、溶解後、10リットルの水を加えて、ブラシノライド含有量が0.1ppmであるブラシノライド水溶液を調製した。

#### (3) ブラシノライド0.5ppm含有水溶液

ブラシノライド（富士薬品工業社製）5mgに数mlのエタノールを加え溶解し、溶解後、10リットルの水を加えて、ブラシノライド含有率が0.5ppmであるブラシノライド水溶液を調製した。

【0064】〔2〕生育試験（1994年5月～11月に実施）

2種のワタ植物、すなわちスーピマ(G. barbadense)と、ワタ繊維の形成がほとんど見られないワタ植物の突然変異体品種であるリガン・リントレス2(G. hirsutum) (USDA-ARS, Southern Crops Res. Lab.のKohel博士より提供)を供試材料として用いた。1994年5月11日に両植物の種子を苗床に播種し、発芽2週間後に苗を圃場に移植した。1994年7月15日から、これらのワタ植物は開花を始め、開花2日目から散布処理を開始した。散布処理は子房付近全体に繊維伸長期である開花20日目まで、毎日、上記ブラシノライド含有水溶液をハンドスプレーを用いて散布することによって行なった。

【0065】開花50～60日目に子房（さく果）が開裂し、乾燥後、胚珠を収穫し繊維を種子から分離し、繊維特性の評価を行った。スーピマの繊維特性の評価については、(1)900HVIシステム(Spinlab社製)による、繊維長、繊維強度、繊維繊度、(2)ソーター法による繊維長、プレスレーによる繊維強度について測定し、その結果を下記表1および表2に示した。

#### 【0066】

【表1】

処理剤	濃度 (ppm)	繊維長 (inch)	繊維強度 (g/tex)	繊維繊度 (μg/inch)
無処理	0	1.421 ± 0.019	47.804 ± 3.362	4.309 ± 0.086
ブラシノライド	0.01	1.463 ± 0.024	49.402 ± 2.268	4.255 ± 0.067
ブラシノライド	0.1	1.455 ± 0.015	50.373 ± 3.231	4.507 ± 0.069
ブラシノライド	0.5	1.507 ± 0.019	52.133 ± 2.329	4.548 ± 0.040

#### 【0067】

【表2】

処理剤	濃度 (ppm)	繊維長 (inch)	繊維強度 (1000lbs/in <sup>2</sup> )
無処理	0	1.480 ± 0.042	108.050 ± 1.717
ブラシノライド	0.01	1.503 ± 0.021	114.914 ± 5.149
ブラシノライド	0.1	1.534 ± 0.026	111.783 ± 2.615
ブラシノライド	0.5	1.570 ± 0.031	120.150 ± 1.863

【0068】表1および表2の結果より、ワタ植物にブラシノライド水溶液を散布処理することによって、ワタ繊維の繊維長、繊維強度、繊維繊度のいずれも顕著に増

大することが明らかとなった。さらにワタ繊維の収量についても若干の増大が観察された。一方、リガン・リントレス2のワタ繊維の評価は、肉眼による観察を行い、その結果を図1（胚珠）および図2（分割した胚珠）に示す。図1および2から明らかなように、ワタ繊維の収量は、ワタ繊維の形成がほとんど見られないワタ植物の突然変異体品種であるリガン・リントレス2においてさえも増大した。

#### 【0069】実施例2

##### 〔1〕ブラシノステロイド含有液体組成物の調製

各液体組成物の組成において、略号はそれぞれ下記のことを意味する。

BR：ブラシノライド

DMF：ジメチルホルムアミド

PEG1000：ポリエチレングリコール（分子量1000）

EtOH：エタノール

ネオエステリン（クミアイ化学社製）

【0070】下記組成よりなる処理液A、BおよびCを調製した。

##### （1）混合液A（ブランク）

成分	量
DMF	5 g
PEG1000	5 g
ネオエステリン（展着剤）	10 g
EtOH	80 g
計	100 g

##### 【0071】（2）混合液B（BR：0.05 ppm）

成分	量
BR	2.5 mg
DMF	5 g
PEG1000	5 g
ネオエステリン（展着剤）	10 g
EtOH	80 g
計	100 g

##### 【0072】（3）混合液C（BR：0.3 ppm）

成分	量
BR	15 mg
DMF	5 g
PEG1000	5 g
ネオエステリン（展着剤）	10 g
EtOH	80 g
計	100 g

【0073】〔2〕使用したブラシノライド含有組成物上記各混合液を用いて、下記の異なった濃度のブラシノライド含有液状組成物を調製した。

##### （1）ブラシノライド無添加の処理液

混合液Aを500倍の水に希釈し、この希釈液を用いた。

##### （2）ブラシノライド濃度0.05 ppmの処理液

混合液Bを500倍の水に希釈して使用した。

##### （3）ブラシノライド濃度0.3 ppmの処理液

混合液Cを500倍の水に希釈して、この希釈液を使用した。

##### 【0074】〔3〕生育試験（1994年5月～11月

に実施）

実験例1と同様にして試験区及び試験樹を別個に設けて、生育試験を行った。異なったブラシノライド含有組成物によるワタ植物の散布処理方法についても実施例1と同様な方法に従って行った。

【0075】開花50～60日目に子房（さく果）が開裂し、乾燥後、胚珠を収穫し、ワタ繊維を種子から分離し、繊維特性の評価を行なった。その結果を下記表3に示した。

##### 【0076】

【表3】

処理剤	濃度 (ppm)	繊維長 (inch)	繊維強度 (g/tex)	繊維減度 (μg/inch)
無処理	0	1.411 ± 0.022	46.871 ± 3.125	4.223 ± 0.082
ブラシノライド	0.05	1.475 ± 0.017	50.201 ± 2.511	4.497 ± 0.052
ブラシノライド	0.3	1.498 ± 0.020	51.522 ± 2.146	4.538 ± 0.030

【0077】表3の結果より、ワタ植物に界面活性剤や展着剤を含むブラシノライド含有液体組成物を散布することによって、ワタ繊維の繊維長、繊維強度および繊維減度がいずれも顕著に増大することが明らかになった。

##### 【0078】実施例3

〔1〕ブラシノステロイド含有ペースト状組成物の調製  
下記略号はそれぞれ下記のことを意味する。

BR：ブラシノライド

NMP：N-メチルピロリドン

EtOH：エタノール

【0079】下記組成よりなるラノリンペーストAまたはBを調製した。

##### （1）ラノリンペーストA（ブランク）

成分	量
NMP	0.2 ml
EtOH	19.8 g
脱水ラノリン	180 g
計	200 g

##### 【0080】（2）ラノリンペーストB（BR：0.1 ppm）

成分	量
BR	20 μg
NMP	0.2 ml
EtOH	19.8 g
脱水ラノリン	180 g
計	200 g

##### 【0081】〔2〕生育試験（1994年5月～11月）

実験例1と同様にして、試験区及び試験樹を別個の設けて生育試験を行った。ワタ植物の処理方法については上記のラノリンペーストを開花2日目からワタ植物の果梗に塗布し始めた。開花50～60日目に子房（さく果）が開裂し、乾燥後、胚珠を収穫し、繊維を種子から分離し、繊維特性の評価を行った。その結果を下記表4に示した。

##### 【0082】

【表4】

処理剤	濃度 (ppm)	繊維長 (inch)	繊維強度 (g/tex)	繊維細度 (μg/inch)
無処理 ブラシノライド	0 0.1	1.412 ± 0.021 1.449 ± 0.011	48.221 ± 2.175 49.892 ± 2.143	4.290 ± 0.067 4.501 ± 0.032

【0083】表4から、ワタ繊維の繊維長、繊維強度および繊維度がブラシノライド含有ペーストでワタ植物を処理することによって、著しく増加したことが明らかである。

【0084】**実施例4** 胚珠培養での繊維長に対するブラシノライドの効果

ワタ植物の2品種、すなわちリガン・リントレス2 (*Gossypium hirsutum*) 及びコーカー312 (*Gossypium hirsutum*) を圃場で栽培した。開花後、2日目の子房を集め、萼片、包葉および花弁を取り除き、70%エタノールに30秒間漬け殺菌した。さらに10重量%の次亜塩素酸ナトリウムと0.05重量%のTween 20を含む水溶液に20分間浸漬して殺菌した。滅菌したピンセットを用い、子房より無菌的に胚珠を取り出した。あらかじめ下記表5の液体培地50mlを入れ、オートクレーブ殺菌した三角フラスコ内に入れ、32℃で浮遊培養した。

【0085】

【表5】

培地組成	組成1	組成2
リン酸2水素カリウム	2.0mM	2.0mM
ほう酸	0.1mM	0.1mM
モリブデン酸ナトリウム	0.001mM	0.001mM
塩化カルシウム	3.0mM	3.0mM
ヨウ化カリウム	0.0005mM	0.0005mM
塩化コバルト	0.0001mM	0.0001mM
硫酸マグネシウム	2.0mM	2.0mM
硫酸マンガン	0.1mM	0.1mM
硫酸亜鉛	0.03mM	0.03mM
硫酸銅	0.001mM	0.001mM
硫酸カリウム	50.0mM	50.0mM
硫酸鉄	0.03mM	0.03mM
EDTA 2ナトリウム	0.03mM	0.03mM
ニコチン酸	0.004mM	0.004mM
ピリドキシン塩酸塩	0.004mM	0.004mM
チアミン塩酸塩	0.004mM	0.004mM
ミオイノシトール	1.0mM	1.0mM
D-グルコース	100.0mM	100.0mM
D-フルクトース	20.0mM	20.0mM
インドール酢酸	5.0μM	5.0μM
ジベレリン	0.5μM	0.5μM
ブラシノライド	1.0μM	0μM
pH	6.8	6.8

【0086】組成1の培地（ブラシノライド添加）で培養した胚珠を処理区、一方、組成2の培地（ブラシノライド無添加）で培養したものを対照区とした。

【0087】〔1〕リガンリントレス2 (*Gossypium hirsutum*)

30日間培養後、リガン・リントレス2ワタ繊維の繊維長を測定した。繊維長の測定方法は、次のとおりで行った。まず、極細のピンセットで胚珠より繊維を取り出し、取り出した繊維は絡み合った単繊維なので、各々単繊維に分離した。単繊維の確認は顕微鏡で行ない、繊維長は定規で両処理区とも100本ずつ測定した。処理区の胚珠の繊維長は、1.98 ± 0.27 cm、対照区の胚珠の繊維長は、1.70 ± 0.19 cmであった。さらに、培養30日目の胚珠を室温条件下で十分乾燥後、胚珠からワタ繊維を取出し、胚珠一つ当たりの繊維重量

を測定した。処理区では8.85 mg、対照区では7.02 mgであった。

【0088】〔2〕コーカー312 (*Gossypium hirsutum*)

コーカー312についてもブラシノライドの効果を調べた。両処理区からのフラスコから培養14日目の胚珠を取出し、互いに比較したところ、肉眼で明らかにワタ繊維収量が増大しているのが観察された。その結果を図3に示す。

【0089】次に培養30日目の胚珠を、両処理区から16個づつ取出し、ワタ繊維を分離後、繊維長を測定した。処理区では3.60 ± 0.36 cm、対照区では2.60 ± 0.28 cmであり、処理区の方が対照区より25%程長かった。再度、同様な実験を行なったところ、処理区では4.10 ± 0.5 cm、対照区では2.80 ± 0.5 cmであり、処理区の単繊維方が対照区のものより30%程長かった。以上の結果より、ワタ植物の胚珠培養時に培地中にブラシノライドを添加することによって、繊維長、繊維収量のいずれも増大することが明らかとなった。

【0090】**実施例5** ワタ繊維形成に関与する遺伝子のクローニング

1. ポリ(A)<sup>+</sup>RNAの調製

圃場に栽培しているスービマ (*G. barbadense*) を供試材料に用いた。開花5日目～15日目の胚珠（繊維伸長期）と開花後25日～30日（繊維伸長停止期）の胚珠を採取し、それぞれの種子から繊維を分離した。得られたワタ繊維約5gを直ちに液体窒素中で凍結し、液体窒素存在下、乳鉢で細かく粉砕した。その後、10mlの抽出用0.2Mトリス酢酸緩衝液〔5Mグアニジンチオシアネート、0.7%β-メルカプトメタノール、1%ポリビニルピロリドン (M.W.360,000)、0.62%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム含有、pH8.5)〕を加え、ポリロンホモジナイザー (KINEMATICA社製) を用い、氷冷下2分間粉砕した。ただし、β-メルカプトエタノールとポリビニルピロリドンは使用する直前に添加した。その後、粉砕液を17,000×gで20分間遠心分離し、上清を回収した。

【0091】この上清をミラクロスに汙過し、その汙液を遠心管に入れた5.7M塩化セシウム溶液1.5mlに静かに重層し、155,000×g、20℃で20時間遠心した後、上清を捨て、RNAの沈殿を回収した。この沈殿を3mlの10mM Tris-HClおよび1mM EDTA・2Na、pH8.0 (TE緩衝液と呼ぶ) に溶解し、さらに等量のフェノール：クロロホルム：イソamilアルコール (容積比、25:24:1) を加え良く混合した後、遠心分離を行って上層の水層を回収した。得られた水層に、1/10倍量の3M酢酸ナトリウム (氷酢酸でpH6.2に調製) と、2.5倍量のエタノールを添加して良く混合し、-20℃で一晩静

置した。その後、 $17,000\times g$ で20分間遠心分離し、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄して、減圧乾燥した。

【0092】この乾燥標品を $500\mu l$ の前述のTE緩衝液に溶解し、全RNA溶液を得た。このRNA溶液を $65^{\circ}\text{C}$ で5分間インキュベートした後、氷上で急冷した。これに $2\times$ 結合緩衝液( $10\text{mM Tris-HCl}$ 、 $5\text{mM EDTA}\cdot 2\text{Na}$ 、 $1\text{M NaCl}$ 、 $0.5\%$  SDS、 $\text{pH}7.5$ )を等量になるようにRNA溶液に加え、平衡化緩衝液( $10\text{mM Tris-HCl}$ 、 $5\text{mM EDTA}\cdot 2\text{Na}$ 、 $0.5\text{M NaCl}$ 、 $0.5\%$  SDS、 $\text{pH}7.5$ )で予め平衡化したオリゴdTセルロースカラム(クロンテック社製)に重層した。次いで、カラムを約10倍量の前述の平衡化緩衝液で洗浄した後、溶出緩衝液( $10\text{mM Tris-HCl}$ 、 $5\text{mM EDTA}\cdot 2\text{Na}$ 、 $\text{pH}7.5$ )でpoly(A)+RNAを溶出した。

【0093】得られた溶出液に、 $1/10$ 倍量の前述の3M酢酸ナトリウム水溶液と2.5倍量のエタノールを加え混合し、 $-70^{\circ}\text{C}$ で静置した。その後、 $10,000\times g$ で遠心分離を行ない、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄して減圧乾燥した。この乾燥標品を再度 $500\mu l$ のTE緩衝液に溶解し、オリゴdTセルロースカラム精製を繰り返し行った。得られたpoly(A)+RNAのうち、繊維伸長期由来のpoly(A)+RNAについてはcDNAライブラリーと、ディファレンシャルスクリーニングに用いるcDNAプローブの作製に用い、繊維伸長停止期由来のpoly(A)+RNAについてはディファレンシャルスクリーニングに用いるcDNAプローブの作製に用いた。

【0094】2. 繊維伸長期特異的cDNAライブラリーの作製  
cDNAライブラリーの作製はZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製)を使用した。上記1.で得られた繊維伸長期由来のpoly(A)+RNAを鋳型として、オリゴ(dT)プライマーと逆転写酵素を用い、GublerとHoffmanらの方法[Gene, 25, 263-269(1983)]に従い、2本鎖cDNAを合成した。得られたcDNAの両末端にEcoRIアダプター(内部にXhoIとSpeIサイトを持つ)を連結し、連結したDNAをXhoIで消化した後、それをλファージベクター、λZAPIIアームのEcoRIとXhoI部位に連結後、インビトロパッケージングキット(Stratagene社製、GIGAPACK Gold)を用い、該ベクターのパッケージングを行ない、大腸菌SURE株( $\text{OD}_{680}=0.5$ )に感染させることにより多数の組換えλファージを得た。これをワタ繊維伸長期に特異的なcDNAライブラリーとした。このライブラリーのサイズは $5.0\times 10^6$ であった。

【0095】3. プローブの作製

繊維伸長期(5日目～15日目)と繊維伸長停止期(25日目～30日目)の繊維からそれぞれ調製したpoly(A)+RNAを鋳型として、オリゴ(dT)プライマーと逆転写酵素M-MLV(東洋紡社製)を用いてcDNAを合成した。合成後、poly(A)+RNAを取り除くためにアルカリ加水分解処理を行ない、得られたcDNAを鋳型として、Random Primed DNA Labeling Kit(USB社製)を用いて、 $^{32}\text{P}$ 標識プローブを作製した。得られた $^{32}\text{P}$ 標識cDNAをディファレンシャルスクリーニングのプローブに用いた。繊維伸長期のcDNAより調製したものをポジティブプローブ、繊維伸長停止期のcDNAより調製したものをネガティブプローブにしてディファレンシャルスクリーニングを行なった。

【0096】4. 繊維の形成及び伸長に関与する遺伝子のスクリーニング

繊維伸長期のcDNAライブラリーを構成する上記ファージを大腸菌に感染させてLB寒天培地上で増殖させ、約50,000個のファージDNAをそれぞれ2枚のナイロンメンブレン(ハイボンド-N、アマシャム社製)に写し取った。

【0097】ファージDNAを写し取ったナイロンメンブレンをアルカリ変性液( $0.5\text{M NaOH}$ 、 $1.5\text{M NaCl}$ )を含んだ濾紙上に移し、4分間放置し、次に中和液( $0.5\text{M Tris-HCl}$ 、 $1.5\text{M NaCl}$ 、 $\text{pH}8.0$ )を含んだ濾紙上に移し、ナイロンメンブレンを5分間放置した。 $2\times\text{SSC}$ ( $0.3\text{M NaCl}$ 、 $0.03\text{M}$  クエン酸三ナトリウム)で洗浄した後、メンブレンをストラタリンカー(Stratagene社製)を用い、DNAの固定を行なった。固定処理を行なったナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション溶液[50%ホルムアミド、 $0.5\%$  SDS、 $6\times\text{SSPE}$ ( $3\text{M NaCl}$ 、 $0.2\text{M NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $20\text{mM EDTA}\cdot 2\text{Na}$ 、 $\text{pH}7.4$ )、 $5\times$ デンハルト溶液( $0.1\%$  フィコール、 $0.1\%$  ポリビニルピロリドン、 $0.1\%$  ウシ血清アルブミン)、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$  変性サケ精子DNAを含有]中において、 $42^{\circ}\text{C}$ で3時間プレハイブリさせ、上記3.で作製したcDNAプローブをそれぞれのメンブレンに加え、 $42^{\circ}\text{C}$ で20時間ハイブリダイズさせた。その後、メンブレンを取り出し、 $2\times\text{SSC}$ 、 $1\times\text{SSC}$ 、 $0.5\times\text{SSC}$ および $0.1\%$  SDSを含有する溶液を用いて、 $42^{\circ}\text{C}$ で1時間～2時間洗浄した。これらのメンブレンを乾燥した後、X線フィルムを密着させて一晚感光させた。

【0098】その結果、伸長停止区(ネガティブ)より、伸長区(ポジティブ)から得たプローブで強くハイブリダイズした陽性クローンを34個選抜することができた。そのうち、KC22と命名したクローンについて解析を進めた。KC22は、ダイズのブラシノステロイドによって発現が誘導される遺伝子(BRU1)[D.M.

Zurek and S.D.Clouse, Plant Physiol (ROCKV) 102, 132. (1993)〕、アズキ、ダイズ等のキシログルカントランスフェラーゼ〔西谷ら、J.Biol.Chem. 268, 25364-25368, (1993)〕やアラビドプシスの頂端分裂組織に特異的に発現するmeri-5遺伝子〔Medford, J.I., Elmer, J. S., and Klee, H.J., Plant Cell, 3, 359-370, (1991)〕と部分的に相同性がある。このキシログルカントランスフェラーゼは、植物細胞壁の主要成分である、キシログルカンの架橋の繋ぎ換えを触媒する酵素であり、細胞壁伸展に関与する基幹酵素の一つであると考えられている。

【0099】さらに、KC22についてブラシノライド処理区と対照区から単離されたRNAを用いてノーザン解析を行なったところ、KC22はブラシノライドによって調節されていることが明らかとなった。

【0100】KC22のファージDNAから、インビボ・エクシジョン法によりcDNAインサートを持つプラスミドクローンpKC22を調製した。インビボ・エクシジョン法は、ZAP-cDNA Synthesis Kit (Staratagene社製)の方法に従った。まず、KC22を含むファージ液200 $\mu$ l、大腸菌XL1-Blue懸濁液200 $\mu$ l、ヘルパーファージR408懸濁液1 $\mu$ lを混ぜ、37℃で15分間インキュベートした後、3mlの2 $\times$ YT培地を加え、37℃で2時間振盪培養し、70℃で20分間処理し、遠心分離(4,000 $\times$ g、10分間)して上清を回収した。得られた上清30 $\mu$ lと大腸菌SOL R懸濁液30 $\mu$ lを混ぜ、混合物を37℃で15分間インキュベートした後、アンピシリンを50ppm含むLB寒天培地に植菌し、37℃で一晩培養した。コロニーを形成した大腸菌は、cDNAインサートを持つプラスミドクローンpKC22を含んでいる。

【0101】このプラスミドpKC22中のDNA挿入配列の塩基配列決定を、ダイデオキシ法〔Messing, Methods in Enzymol., 101, 20-78(1983)〕により行なった。得られた塩基配列を配列番号1、及びこの配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号2に示す。また、両者を配列番号3に示す。これらの配列は、繊維の形成および伸長時に発現量が変化する遺伝子のcDNAの塩基配列、及びアミノ酸配列を示すものである。

【0102】5. 大腸菌による目的遺伝子の発現  
上記にて得られた形質転換体を100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB培地50mlに懸濁し、37℃で振盪培養した。培養液の濁度がOD<sub>660</sub>=0.2となったところで、終濃度10mMとなるようにイソプロピルー $\beta$ -D-チオガラクトピレノシド(IPTG)を加え、37℃で、濁度がOD<sub>660</sub>=1.0に達するまで振盪培養した。培養終了後、1,600 $\times$ g、15分間遠心し、菌体を回収した。回収した菌体を4倍量のLysis buffer〔50mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA $\cdot$ 2Na、1 $\mu$ M PMSF (フェニルメチ

ルスルフォニルフルオリド)、10%シュクロース〕に懸濁し、さらに、リソチーム(シグマ社製)を終濃度1mg/mlになるように加え、10分間氷上に静置した。10分後、Nonidet P-40(シグマ社製)を終濃度1%になるように加え、さらに10分間氷上に静置し、その後、48,000 $\times$ gで1時間遠心した。得られた上清に等量の2 $\times$ Laemli sample buffer〔0.125M Tris-HCl (pH6.8)、20%グリセロール、10% $\beta$ -メルカプトエタノール、6%SDS、0.1%ブロモフェノール・ブルー〕を加え、2分間ボイルした後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行なった。電気泳動終了後、ゲルをクマシーブリリアントブルー(CBB)により染色し、7%酢酸、25%メタノール液にて脱色を行なった。目的とする分子量39kDa付近にバンドが見られ、目的遺伝子の発現を確認した。

【0103】6. シロイヌナズナの形質転換体の作製  
(1) プラスミドの構築

配列番号1に示したKC22の塩基配列よりオープンリーディングフレームをすべて含むように、DraIで切断した。このDraI断片をpUC19のSmaIサイトにサブクローニングした。このプラスミドをSalIおよびHindIIIで切断し、35SプロモーターのHindIII-XhoI断片をサブクローニングした。つぎにこのクローンをHindIIIおよびSacIで切断し、バイナリーベクターpBI101-Hm2のHindIIIとSacIの間にサブクローニングした。このプラスミドをpBI35S-22と命名した。このプラスミドの構築を図4に示す。なお、形質転換された大腸菌JM109を、大腸菌JM109/pBI35S-22と命名した。

【0104】(2) プラスミドのアグロバクテリウムへの導入

上記6-(1)で得られた大腸菌pBI35S-22とヘルパープラスミドpRK2013を持つ大腸菌HB101株を、それぞれ50mg/lのカナマイシンを含むLB培地で37℃で1晩、アグロバクテリウムEHA101株を50mg/lのカナマイシンを含むLB培地で37℃で2晩培養した。各培養液1.5mlをエッペンドルフチューブに取り、集菌したのち、LB培地で洗浄した。これらの菌体を1mlのLB培地に懸濁後、3種の菌を100 $\mu$ lずつ混合し、LB培地寒天培地にまき、28℃で培養して、プラスミドをアグロバクテリウムに接合伝達させた。1~2日後に培地の一部を白金耳でかきとり、50mg/lカナマイシン、20mg/lハイグロマイシンB、25mg/lクロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に塗布した。28℃で2日間培養した後、単一コロニーを選択した。得られた形質転換体をEHA101/pBI35S-22と命名した。

【0105】(3) 無菌シロイヌナズナの栽培

シロイヌナズナ、*Wassilewskija*株（以下、WS株と称す）の種子（大阪大学、新名博彦博士より提供）数10粒を1.5mlチューブに入れ、70%エタノール1mlを加え3分間放置した。続いて滅菌液（5%次亜塩素酸ナトリウム、0.02%Triton X-100）に3分間浸し、滅菌水で5回洗浄した後に、MSOプレート（ムラシゲースクーク無機塩類4.6g、ショ糖10g、1000×ビタミンストック液1ml/リットル、pH6.2）に置床した。このプレートを4℃に2日間放置して低温処理を行い、続いて植物インキュベーター（サンヨー製、MLR-350HT）中に22℃、光強度6000ルクス、長日条件下（明期16時間、暗期8時間）にて、10日間培養した。

【0106】（4）アグロバクテリウムの感染  
前記（3）で10日間培養した上記WS株の根を数株ずつそろえて、メスで1.5～2.0cm程度に切りそろえ、CIMプレート（MSOプレートに2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を終濃度0.5μg/ml、カイネチンを0.05μg/mlとなるように加えたもの）に置き並べた。光強度3000ルクス、長日条件下（16時間明期、8時間暗期）で2日間培養し、MS希釈液（ムラシゲースクーク無機塩類6.4g/l、pH6.3）で3倍に希釈したものをそれぞれ1mlずつチューブに分注し、この中にカルス化した根の切片を10分間浸した。これらの切片を2枚重ねた滅菌ろ紙上に並べ、余分な水分を除き、新しいCIMプレートに各々置き換えた。同条件にて2日間共存培養した。

【0107】（5）除菌  
各々の菌株が肉眼で観察できるまで十分に増殖した切片を除菌液（MS希釈液にクラフォランを終濃度200μg/mlになるように加えたもの）に移し、ゆっくり振盪させて60分間洗浄した。この操作を5回繰り返した後、これらの切片から滅菌ろ紙上で水分を取り除き、SIMCプレート（MSOプレートに、2-IPを終濃度5μg/ml、IAAを終濃度0.15μg/ml、クラフォランを終濃度500μg/mlとなるように加えたもの）に置き並べ、光強度6000ルクス、長日条件下（16時間明期、8時間暗期）で2日間培養した。

【0108】（6）形質転換植物の選択  
2日間培養した上記切片をSIMCSプレート（SIMCプレートにハイグロマイシンBを終濃度4.6U/mlとなるように加えたもの）に移植し、光強度6000ルクス、長日条件下（16時間明期、8時間暗期）で培養した。以後、これらの切片を1週間毎に新しいSIMCSプレートに移植した。形質転換した切片は増殖を続け、ドーム状に盛り上がったカルスとなるが、非形質転換体は褐変した。形質転換体は約2週間後、カルスが緑色を呈し、約1カ月後、シュートが形成された。

【0109】（7）形質転換植物の再生  
シュートとなった植物体の根本を、カルス部分を含まな

いように剃刃もしくはメスで切り取り、RIMプレートに軽く乗せるように挿した。8～10日後、1～2cm程度の根が数本形成した植物をピンセットで、無機塩類培地（5mM KNO<sub>3</sub>、2.5mM K-リン酸緩衝液（pH5.5）、2mM MgSO<sub>4</sub>、2mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、50μM Fe-EDTA、1000×微量要素（70mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、14mM MnCl<sub>2</sub>、0.5mM CuSO<sub>4</sub>、1mM ZnSO<sub>4</sub>、0.2mM NaMoO<sub>4</sub>、10mM NaCl、0.01mM CoCl<sub>2</sub>）1ml/リットル）に浸したロックウールミニポット（日東紡績社製）に定植し、培養した。開花し、さや形成後は、パーライトとパーキュライト（TES社製）を1:1に混合し、無機塩類混合培地に浸して調製した土壌に植え換えた。約1カ月後、1株につき数百粒の種子が得られた。これを以後、T1種子と称す。

【0110】（8）抗生物質耐性株の取得  
T1種子約100粒を上記（3）と同様の方法で滅菌し、MSHプレートに播種した。ほぼ3:1の割合でハイグロマイシンB耐性株が発芽した。

【0111】7. DNA抽出とサザンハイブリダイゼーション

発芽した上記T1種子を、無機塩類培地に浸したロックウールミニポットにピンセットで移植し、光強度6000ルクス、長日条件下（16時間明期、8時間暗期）、22℃の条件下で培養した。2週間後、ロックウールの表面をナイフで撫でるようにメスで植物の地上部を切り取り、直ちに液体窒素で凍結した。凍結した地上部を液体窒素存在下、乳鉢で細かく粉碎し、1g当たり、3mlのDNA抽出用緩衝液〔200mM Tris-HCl（pH8.0）、100mM EDTA-2Na、1% N-ラウロイルサルコシナトリウム、100μg/ml プロテナーゼK〕を加え、十分攪拌した。60℃1時間インキュベート後、遠心（10,000×g、10分間）し、上清をミラクロスで濾過し、濾液を新しいチューブに移した。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1）の混合液で抽出を3回行なった後、エタノール沈殿を行った。沈殿をTE緩衝液に溶解した。それぞれ植物体約2.0gから、20μgずつのゲノムDNAが得られた。このうち、1μgのゲノムDNAを制限酵素EcoRIおよびHindIIIで切断し、1%アガロース電気泳動及びサザンハイブリダイゼーションに供した。

【0112】また、同様に形質転換を行っていないWS株の種子を発芽、生育させ、植物体より、同様にDNAを抽出し、制限酵素EcoRIおよびHindIIIによる消化を行ない、1%アガロースゲル電気泳動及びサザンハイブリダイゼーションに供した。ハイブリダイゼーション用プローブはpKC22を用いた。サザンハイブリダイゼーションは、モレキュラー クローニング、アラボラトリー マニュアル（Molecular Cloning, AL

boratory Manual)、第9章、第31～58頁〔コールド スプリング ハーバー (Cold Spring Harbor) 社、1989年刊〕に記載の方法に従って行った。すなわち、それぞれのDNA試料について1%アガロースゲル電気泳動を行ない、電気泳動後、アルカリ変性を行ないナイロンメンブレン (ハイボンド-N、アマシャム社製) 上に一晚サザンブロットした。該メンブレンに紫外線トランスイルミネーター (254nm) を3分間照射させ、DNAを固定した。このメンブレンをプレハイブリダイゼーション緩衝液 (5×デンハルト液、6×SSC、0.1%SDS、10μg/mlサケ精子DNA) 5ml中で50℃、2時間プレハイブリダイゼーションを行なった。次いでプローブを加え、50℃で一晩ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションの後、該メンブレンを2×SSC、0.1%SDSを含む洗浄液で室温にて10分間、2回洗浄し、続いて同じ洗浄液で50℃、30分間で2回洗浄した。メンブレンは乾燥させた後、X線フィルム (コダック社製) を入れたカセット内で-80℃、一晚感光させ、オートラジオグラフィを行った。形質転換を行っていない株 (1)、pKC22を導入した形質転換体 (2)、ベクターのみを導入した形質転換体 (3) について、サザンハイブリダイゼーションにより検出されたシグナルのパターンを

## 配列

```

CAATAATTCT CTCTGTTTCT CTGGTTTAAA CATGGGTATG GGTTTAAGGA ATGGATTCT 60
TTTGATTTTA TCTTGTGTG TTACACTTTC CCTCTCAGT TTGGGGCGAC CTGCCACTTT 120
CCTTGAAGAT TTTAGAATCA CTTGGTCTGA TTCTCATATT AGGCAAAATCG ATGGAGGGAG 180
AGCCATCCAA CTTGTTCTCG ACCAAAATTC AGGCTGTGGA TTTGCTTCTA AAAGGCAGTA 240
TTTGTTGCGA CGTGTGAGCA TGAAAATCAA GCTCATCCCC GCGGACTCCG CCGGAACAGT 300
CACCGCCTTT TATATGAATT CTGTTACAGA TGCTGTGCGA GATGAGCTAG ACTTCGAGTT 360
CTTGGAAGAC CGTACCGGGC AGCCATATAC GGTTCAAACC AATATCTATG CCCATGAAAA 420
GGGTGACAGG GAACAAAGGG TTAACCTTTG GTTCGATCCT GCTGCAGATT TCCATACTTA 480
CTCAATCATG TGGAACCATC ATCAGATTGT GTTCTATATT GATGAAGTGC CAATTAGGGT 540
TTATAAGAAC AATGAAGCTA GAAATATCCC ATACCCAAAA CTCCAGCCAA TGGGAGTTTA 600
TTCAACGCTG TGGGAGGCTG ATGATTGGGC AACAAGGGGA GGTTTAGAGA AAATTGATTG 660
GACCAAGACT CCGTTCCTAG CTTATTACAA GGACTTCGAC ATTGAAGGAT GTCCGGTTCC 720
AGGGCCAGTA AACTGTGCCA CAAACAGTAG GAACTGGTGG GAGGGCACTG CTTATCAAGC 780
CCTTAATGCC ATGGAAGCTA AAAGATATAG TTGGGTTCGT ATGAACCACG TGATATACGA 840
TTACTGCACC GACAAGTCCC GTTACCCGGT TACCCACCG GAGTGATGT CCATCATCTG 900
AAAATCCAAA CCAAGTGAA GTTTCGTGTC CTATTTTACG TACATATGTA CCTCCCTTTA 960
TACAAATAAT AGAGCCATGC AAAAATTGGG TTTTAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1020
AAAAAAAAA AAAAA 1035

```

## 【0115】配列番号: 2

配列の長さ: 289

配列の形: アミノ酸配列

配列の種類: タンパク質

起源

生物名: ゴシビウム バルバデンセ (Gossypium barbad

## 配列

Met Gly Met Gly Leu Arg Asn Gly Phe Leu Leu Ile Leu Ser Cys

比較した。

【0113】形質転換体 (2) には、(1)、(2)、(3) 共通の内在性のシグナルのほかに、EcoRIで切断したサンプルでは約1.6kbpと0.7kbp、HindIIIで切断したサンプルでは約6kbpの位置に、特異的なシグナルが観察され、目的遺伝子が形質転換 (2) に組み込まれていることが観察された。

## 【0114】

## 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1035

配列の形: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: ゴシビウム バルバデンセ (Gossypium barbadense)

組織の種類: ワタ繊維

直接の起源

ライブラリー名: ワタ繊維組織由来cDNAライブラリー

クローン名: KC22

ense)

組織の種類: ワタ繊維

直接の起源

ライブラリー名: ワタ繊維組織由来cDNAライブラリー

クローン名: KC22



5	10	15
Val Val Thr Leu Ser	Leu Ser Val Leu Gly Arg Pro Ala Thr Phe	
20	25	30
Leu Glu Asp Phe Arg	Ile Thr Trp Ser Asp Ser His Ile Arg Gln	
35	40	45
Ile Asp Gly Gly Arg	Ala Ile Gln Leu Val Leu Asp Gln Asn Ser	
50	55	60
Gly Cys Gly Phe Ala	Ser Lys Arg Gln Tyr Leu Phe Gly Arg Val	
65	70	75
Ser Met Lys Ile Lys	Leu Ile Pro Gly Asp Ser Ala Gly Thr Val	
80	85	90
Thr Ala Phe Tyr Met	Asn Ser Val Thr Asp Ala Val Arg Asp Glu	
95	100	105
Leu Asp Phe Glu Phe	Leu Gly Asn Arg Thr Gly Gln Pro Tyr Thr	
110	115	120
Val Gln Thr Asn Ile	Tyr Ala His Gly Lys Gly Asp Arg Glu Gln	
125	130	135
Arg Val Asn Leu Trp	Phe Asp Pro Ala Ala Asp Phe His Thr Tyr	
140	145	150
Ser Ile Met Trp Asn	His His Gln Ile Val Phe Tyr Ile Asp Glu	
155	160	165
Val Pro Ile Arg Val	Tyr Lys Asn Asn Glu Ala Arg Asn Ile Pro	
170	175	180
Tyr Pro Lys Leu Gln	Pro Met Gly Val Tyr Ser Thr Leu Trp Glu	
185	190	195
Ala Asp Asp Trp Ala	Thr Arg Gly Gly Leu Glu Lys Ile Asp Trp	
200	205	210
Thr Lys Ala Pro Phe	Leu Ala Tyr Tyr Lys Asp Phe Asp Ile Glu	
215	220	225
Gly Cys Pro Val Pro	Gly Pro Val Asn Cys Ala Thr Asn Ser Arg	
230	235	240
Asn Trp Trp Glu Gly	Thr Ala Tyr Gln Ala Leu Asn Ala Met Glu	
245	250	255
Ala Lys Arg Tyr Ser	Trp Val Arg Met Asn His Val Ile Tyr Asp	
260	265	270
Tyr Cys Thr Asp Lys	Ser Arg Tyr Pro Val Thr Pro Pro Glu Cys	
275	280	285
Met Ser Ile Ile		
289		

【 0 1 1 6 】 配列番号 : 3

配列の長さ : 1035

配列の形 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ゴシピウム バルバデンセ (Gossypium barbadense)

組織の種類 : ワタ繊維

直接の起源

ライブラリー名 : ワタ繊維組織由来 cDNA ライブラリー

クローン名 : KC22

配列

CAATAATTCT CTCTGTTTCT CTGGTTTAAA C ATG GGT ATG GGT TTA AGG AAT	52
Met Gly Met Gly Leu Arg Asn	

GGA TTT CTT TTG ATT TTA TCT TGT GTT GTT ACA CTT TCC CTC TCA GTT	100
Gly Phe Leu Leu Ile Leu Ser Cys Val Val Thr Leu Ser Leu Ser Val	
10 15 20	
TTG GGG CGA CCT GCC ACT TTC CTT GAA GAT TTT AGA ATC ACT TGG TCT	148
Leu Gly Arg Pro Ala Thr Phe Leu Glu Asp Phe Arg Ile Thr Trp Ser	
25 30 35	
GAT TCT CAT ATT AGG CAA ATC GAT GGA GGG AGA GCC ATC CAA CTT GTT	196
Asp Ser His Ile Arg Gln Ile Asp Gly Gly Arg Ala Ile Gln Leu Val	
40 45 50 55	
CTC GAC CAA AAT TCA GGC TGT GGA TTT GCT TCT AAA AGG CAG TAT TTG	244
Leu Asp Gln Asn Ser Gly Cys Gly Phe Ala Ser Lys Arg Gln Tyr Leu	
60 65 70	
TTC GGA CGT GTC AGC ATG AAA ATC AAG CTC ATC CCC GGC GAC TCC GCC	292
Phe Gly Arg Val Ser Met Lys Ile Lys Leu Ile Pro Gly Asp Ser Ala	
75 80 85	
GGA ACA GTC ACC GCC TTT TAT ATG AAT TCT GTT ACA GAT GCT GTG CGA	340
Gly Thr Val Thr Ala Phe Tyr Met Asn Ser Val Thr Asp Ala Val Arg	
90 95 100	
GAT GAG CTA GAC TTC GAG TTC TTG GGA AAC CGT ACC GGG CAG CCA TAT	388
Asp Glu Leu Asp Phe Glu Phe Leu Gly Asn Arg Thr Gly Gln Pro Tyr	
105 110 115	
ACG GTT CAA ACC AAT ATC TAT GCC CAT GGA AAG GGT GAC AGG GAA CAA	436
Thr Val Gln Thr Asn Ile Tyr Ala His Gly Lys Gly Asp Arg Glu Gln	
120 125 130 135	
AGG GTT AAC CTT TGG TTC GAT CCT GCT GCA GAT TTC CAT ACT TAC TCA	484
Arg Val Asn Leu Trp Phe Asp Pro Ala Ala Asp Phe His Thr Tyr Ser	
140 145 150	
ATC ATG TGG AAC CAT CAT CAG ATT GTG TTC TAT ATT GAT GAA GTG CCA	532
Ile Met Trp Asn His His Gln Ile Val Phe Tyr Ile Asp Glu Val Pro	
155 160 165	
ATT AGG GTT TAT AAG AAC AAT GAA GCT AGA AAT ATC CCA TAC CCA AAA	580
Ile Arg Val Tyr Lys Asn Asn Glu Ala Arg Asn Ile Pro Tyr Pro Lys	
170 175 180	
CTC CAG CCA ATG GGA GTT TAT TCA ACG CTG TGG GAG GCT GAT GAT TGG	628
Leu Gln Pro Met Gly Val Tyr Ser Thr Leu Trp Glu Ala Asp Asp Trp	
185 190 195	
GCA ACA AGG GGA GGT TTA GAG AAA ATT GAT TGG ACC AAA GCT CCG TTC	676
Ala Thr Arg Gly Gly Leu Glu Lys Ile Asp Trp Thr Lys Ala Pro Phe	
200 205 210 215	
TTA GCT TAT TAC AAG GAC TTC GAC ATT GAA GGA TGT CCG GTT CCA GGG	724
Leu Ala Tyr Tyr Lys Asp Phe Asp Ile Glu Gly Cys Pro Val Pro Gly	
220 225 230	
CCA GTA AAC TGT GCC ACA AAC AGT AGG AAC TGG TGG GAG GGC ACT GCT	772
Pro Val Asn Cys Ala Thr Asn Ser Arg Asn Trp Trp Glu Gly Thr Ala	
235 240 245	
TAT CAA GCC CTT AAT GCC ATG GAA GCT AAA AGA TAT AGT TGG GTT CGT	820
Tyr Gln Ala Leu Asn Ala Met Glu Ala Lys Arg Tyr Ser Trp Val Arg	
250 255 260	
ATG AAC CAC GTG ATA TAC GAT TAC TGC ACC GAC AAG TCC CGT TAC CCG	868
Met Asn His Val Ile Tyr Asp Tyr Cys Thr Asp Lys Ser Arg Tyr Pro	

```

265          270          275
GTT ACC CCA CCG GAG TGC ATG TCC ATC ATC TGAAAATCCA AACCCAAGTG      918
Val Thr Pro Pro Glu Cys Met Ser Ile Ile
280          285
AAGTTTCGTG TCCTATTTTA CGTACATATG TACCTCCCTT TATACAAATA ATAGAGCCAT  978
GCAAAAATTG GGTTTTAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA  1035

```

【図面の簡単な説明】

【図1】ブラシノライド処理をしたリガンリントレス2 (*Gossypium hirsutum*) の生物の形態を示す写真である。

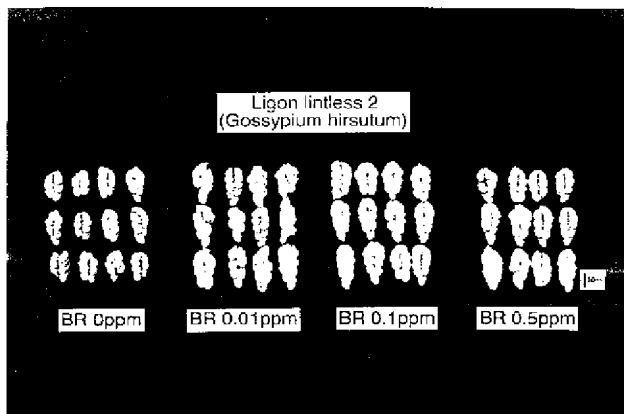
【図2】ブラシノライド処理をしたリガンリントレス2 (*Gossypium hirsutum*) の生物の形態を示す写真である。

る。

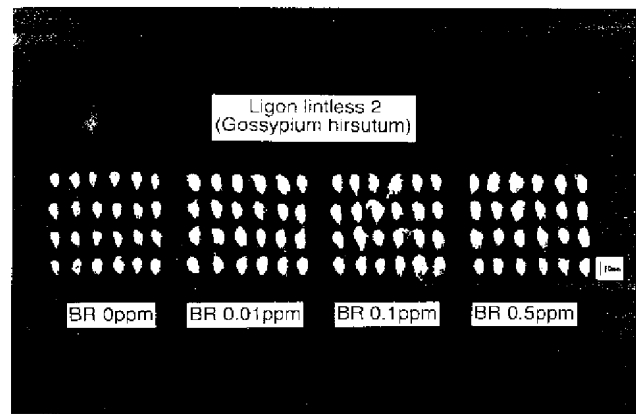
【図3】ブラシノライド処理をしたコーカー312 (*Gossypium hirsutum*) の生物の形態を示す写真である。

【図4】プラスミドpBI35S-22の構築を示す図である。

【図1】



【図2】



【図3】

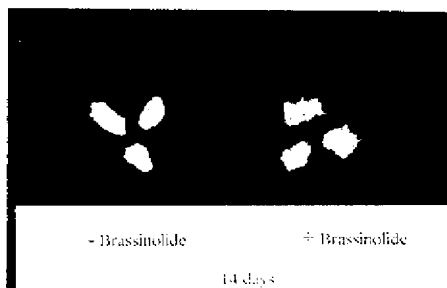
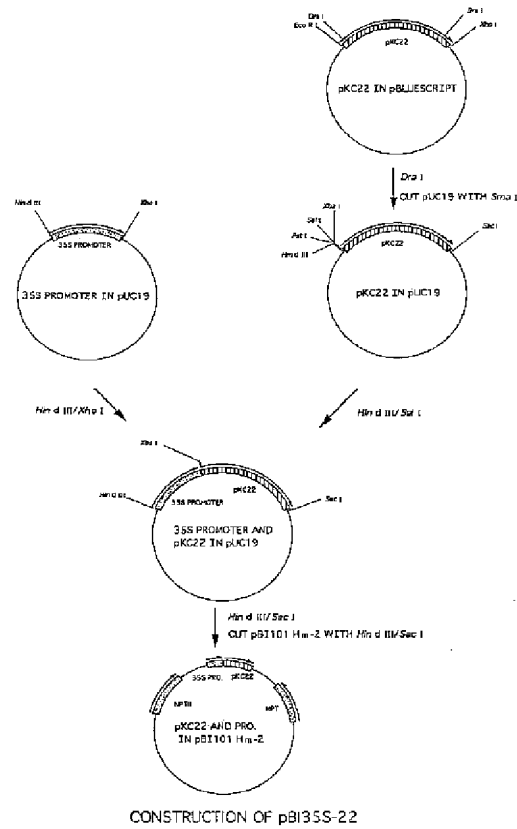


Figure 1. Cotton ovules cultured for 14 days in basal media containing 5  $\mu$ M NAA and 0.5  $\mu$ M  $GA_3$ . Ovules grown without exogenous brassinolide (- Brassinolide) have very short fine fibers at this stage while ovules grown with 1  $\mu$ M brassinolide (+ Brassinolide)

【図 4】



【手続補正書】

【提出日】平成8年2月28日

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

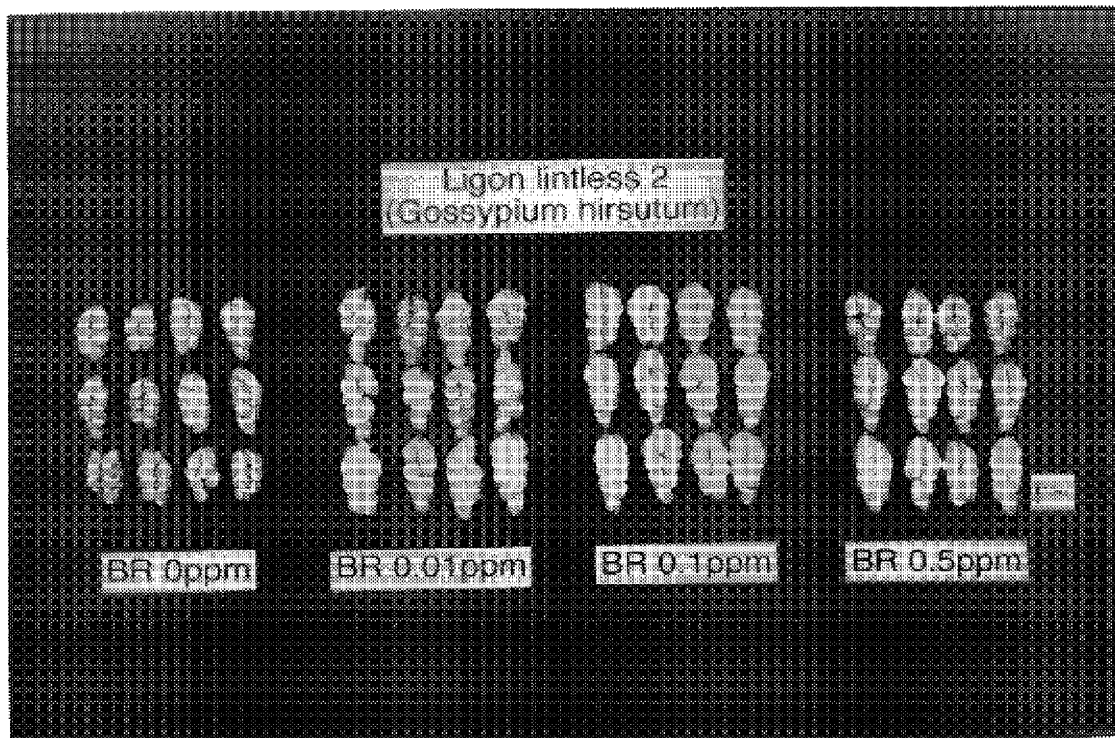
【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】

## 図面代用写真



【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

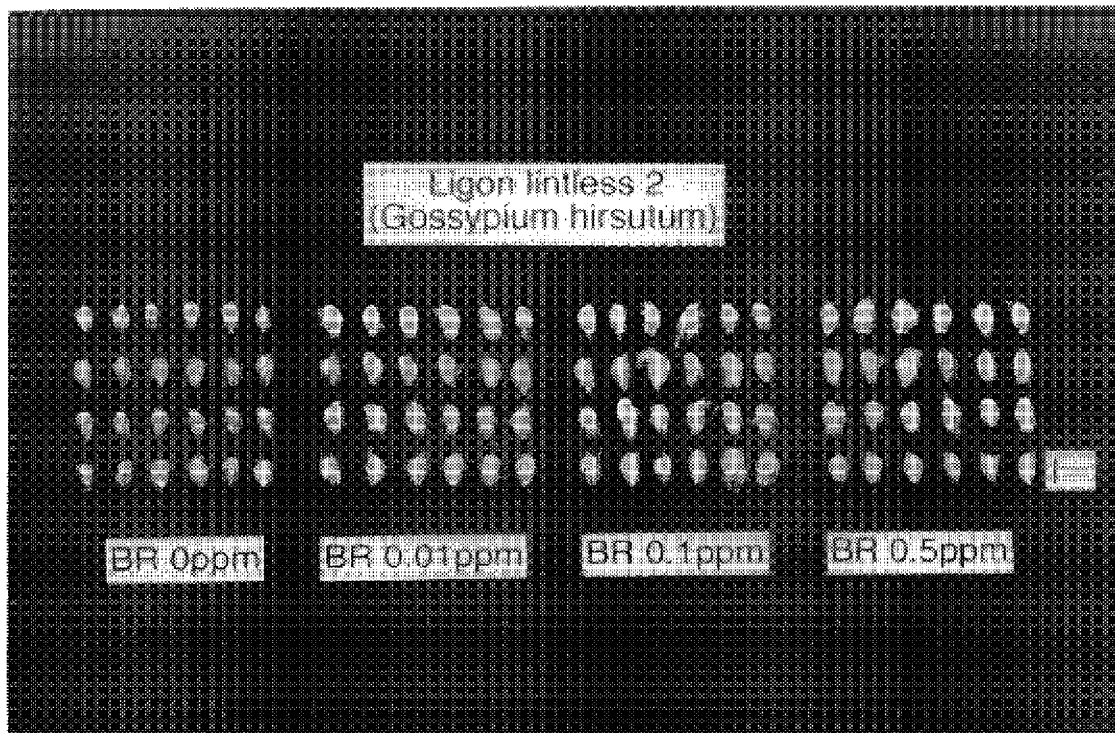
【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】

## 図面代用写真



【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】

## 図面代用写真

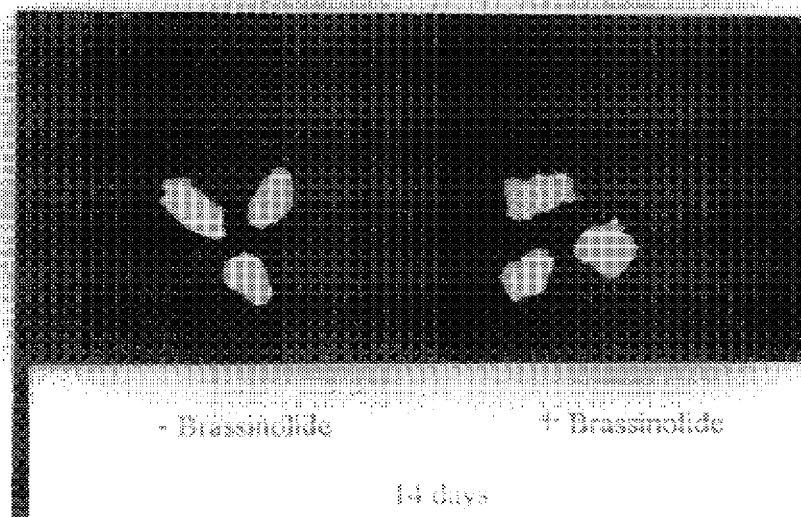


Figure 1. Cotton ovules cultured for 14 days in basal media containing 5  $\mu$ M NAA and 0.5  $\mu$ M  $GA_3$ . Ovules grown without exogenous brassinolide (- Brassinolide) have very short fine fibers at this stage while ovules grown with 1  $\mu$ M brassinolide (+ Brassinolide)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/01		9281-4B	C 1 2 N 5/00	C
15/09	Z N A	9162-4B	15/00	E
// C 0 7 J 73/00		9162-4B		Z N A A
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 藤澤 浩一  
滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡  
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 西口 進  
滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡  
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 前川 宣彦  
滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡  
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 ランディ アレン  
アメリカ合衆国 テキサス州 ラブボッ  
ク, フォーティース ストリート 3104番  
地